
UTILIZACIÓN DE CRITERIOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS EN LA IDENTIFICACIÓN DE CARAOTAS TOLERANTES A ESTRÉS HÍDRICO

Domínguez¹ Amalia, Pérez¹ Yunel, Rea² Ramón, Alemán¹ Silvia, Sosa¹
Maryla, Fuentes¹ Leticia, Darias¹ Rodolfo, Pernía² Beatriz, Domínguez²

Diamarys, Molina² y Daynet Sosa² Sandy

¹Área de Agricultura y Soberanía Alimentaria - IDEA

²Centro de Estudios Biotecnológicos, Facultad de Agronomía,
Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos" - Cuba.

daynetsosa@yahoo.es

Resumen

La falta de agua para riego o su escasez tiene efectos drásticos sobre el rendimiento de las caraotas, por lo que es imprescindible contar con materiales resistentes o tolerantes al estrés hídrico. El objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar 22 cultivares de caraotas de Cuba y Venezuela en función de su tolerancia a estrés hídrico. Se aplicaron dos tratamientos de riego: 70% y 20% de la capacidad de campo (CC), y a ambas se evaluó el contenido relativo de agua (CRA), la apertura estomática, el índice estomático, contenido de prolina y de fenoles totales en hojas. Un análisis de componentes principales para las variables estudiadas fue realizado y representadas mediante una gráfica Biplot; que permitió agrupar como tolerantes a 10 cultivares, a ocho como medianamente tolerantes y a cuatro como susceptibles a un estrés hídrico del 20% de la CC. Los mayores valores de CRA se obtuvieron en los cultivares tolerantes y susceptibles. Los tolerantes no mostraron cambios en la estructura del mesófilo, no así en los susceptibles, donde se evidenció la separación de las células del parénquima clorofílico en empalizada, aumentando los espacios intercelulares. El contenido de prolina libre y de fenoles totales fue significativamente ($p<0,01$) más elevado en los cultivares susceptibles. Se recomienda un grupo de características morfo fisiológicas para ser incorporadas como criterios de selección en la identificación de cultivares de caraota tolerantes a sequía.

Palabras clave: *Phaseolus vulgaris L.*, estomas, fenoles, prolina.

Introducción

La caraota, *Phaseolus vulgaris* L., es la leguminosa de consumo humano más importante a nivel mundial [Broughton *et al.*, (2003)], muy especialmente en las regiones tropicales de América Latina [Beebe *et al.*, (2008)]. Sin embargo, son varios los factores que afectan negativamente su cultivo, especialmente la sequía, que reduce drásticamente la productividad al afectar de manera negativa numerosos procesos fisiológicos y bioquímicos como la fotosíntesis, la respiración, la absorción de nutrientes [Cornic and Briantais, (1991); Yordanov *et al.*, (2003)].

La falta de agua para riego o su escasez (cultivo de secano) tiene efectos drásticos sobre los rendimientos, estimándose que el promedio en la reducción de la producción en diferentes cultivos, es de hasta un 69% en condiciones limitantes de agua (Bray, 2001).

Teniendo en cuenta que en el mundo gran parte del cultivo de leguminosas se desarrolla en zonas de secano (sólo el 7% de la superficie de caraota en América Latina se cultiva bajo buen riego); y que el grado de afección depende del genotipo y de la etapa de desarrollo en la que se encuentre la planta al momento del déficit hídrico; por lo tanto, es necesario contar con materiales tolerantes o resistentes a estrés hídrico así como también adecuar el manejo del cultivo para ofrecer condiciones de crecimiento y desarrollo que reduzcan al mínimo la incidencia de la falta de humedad edáfica. En ese sentido, el desarrollo de nuevos

cultivares con mejores rendimientos bajo condiciones de estrés es todo un desafío, lo cual constituye, un objetivo prioritario de muchos programas de mejora genética. Sin embargo, dentro de varios factores limitantes, encontramos i) el desconocimiento de la variabilidad para la tolerancia a la falta de agua en el germoplasma disponible, y ii) la falta de criterios de selección que puedan ser usados como marcadores de resistencia a algún tipo de estrés y que presenten reproducibilidad, facilidad de medición y detección precoz. En este sentido, la utilización de parámetros que puedan medirse en etapas de desarrollo temprano en las plantas, se consideran criterios de selección o marcadores de estrés.

El objetivo de esta investigación fue evaluar genotipos de caraota bajo condiciones experimentales de sequía mediante parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos.

Materiales y Métodos

Material vegetal

Se emplearon semillas de 22 genotipos de caraotas suministrados por la “Empresa Provincial de Semillas de Matanzas”, de Cuba (CC 259 - colorado C₅E₈T- 1551, CC 259 - negro C₆E₁₁T- 1567, “Milagro Villaclareño” -negro C₅E₃T - 1460 y Bat - 58 C₅E₇T- 1380), y el “Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas” (INIA-CENIAP) de Venezuela (MGM – 08-02-072 negro 2261, MGM- 08-02-026 La Poncha blanco 2839, MGM – 08-02-023 rojo 2238, MGM- 08-02-066 negro 2256, MGM- 10-02-011

Negro 2288, MGM- 10-02- 012 Negro 2289, MGM -10-02-029 Negro 2305, MGM- 10 – 02- 078 Rosada con pinta 2350, MGM – 10-02- 083 Rosada 2215, MEM – 03-02- 002 Poncha Negro 2215, MEM – 03-01-01 Plomito Negro 2150, MGM – 09-02-01 Negro 2279, MGM- 03-99-03 Vaina Blanca Negro 2025, DP- 03-01- 009 Negro Vaina Blanca 2141, DP- 03- 01-026 Negro de Macaira 2148, MGM- 03-02-004 Negro 2216, Tacarigua Negro 07-875 y Montalbán Negro 07-875).

Las semillas se sembraron en un sustrato de tierra y turba, y el riego se mantuvo a plena capacidad de campo (CC), cada dos días durante 28 días, que fue el tiempo en que se desarrollaron los primordios foliares y se formó el primer trifolio. Luego, de manera aleatoria, las plantas se distribuyeron en tres grupos y a cada uno se le aplicó un tipo de riego diferente: T1: 70 % riego normal y T2: 20% (estrés severo) de CC. Se utilizó un diseño completamente al azar en arreglo factorial.

Comportamiento de las variedades ante el déficit hídrico

Una vez que se detectaron los primeros síntomas de marchitez, las hojas de los distintos genotipos estresados y no estresados fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a – 80°C para realizar las determinaciones de contenido de prolina y fenoles totales. Las plantas fueron clasificadas como tolerantes (T), medianamente tolerantes (MD) y susceptibles (S), según su respuesta al estrés hídrico al que fueron

sometidas. Se tuvo en consideración el estado de marchitez aparente del primordio foliar de las plantas bajo condiciones experimentales de estrés hídrico, sin que llegara a alcanzar el punto de marchitez permanente.

Índice estomático y apertura estomática

Una semana después de aplicar los diferentes tratamientos de riego, se realizó un estudio anatómico de la epidermis en las hojas del primordio, mediante improntas de las mismas según la técnica descrita por Rodés y Collazo (2006). El índice estomático (IE) se determinó utilizando la fórmula de Salisbury sugerida por Wilkinson (1979). La estructura del mesófilo y la apertura estomática fue observada en cortes transversales de la parte media de la lámina foliar de 18 Rm realizados con un micrótomo de congelación (marca Leica CM 1850); observándose, por cada variante experimental, 5 muestras en un microscopio óptico Leica a 10X y 40X de lente objetivo. Las imágenes se capturaron y procesaron con el programa Micrometrics SE Premium.

Contenido relativo de agua (CRA)

Se utilizaron discos foliares de 1 cm. de diámetro los cuales fueron pesados en una balanza digital Sartorius para la determinación de la masa fresco (5 discos por tratamiento de plantas diferentes). La fórmula para la determinación del CRA fue la descrita por Ascón y Taylón, (2000).

Determinación de prolina

La determinación de prolina se realizó

según Bates *et al.*, (1973). La cantidad de prolina (mg/ml) fue determinada a partir de una curva estándar en el rango de 20 – 100 µg.

Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales (solubles y ligados a la pared celular) se extrajeron siguiendo el procedimiento de Gurr *et al.*, (1992). Para la cuantificación total de los mismos, se utilizó el procedimiento de Hoagland (1990); expresándose el contenido de compuestos fenólicos en mg/g de masa fresca referido a una curva patrón de ácido clorogénico.

Análisis e interpretación de los datos

En la identificación de los criterios anatómicos y bioquímicos (indicadores) para la selección de genotipos tolerantes al déficit hídrico comparados con los testigo en condiciones de laboratorio, se realizaron análisis de componentes principales (ACP) para las variables índice estomático, apertura estomática, contenido de prolina, fenoles totales y CRA, que fueron representadas mediante una gráfica Biplot (Jolliffe, 2002). Todos los análisis fueron realizados utilizando el programa InfoStat ver. 2010 [Di Rienzo *et al.*, (2010)].

Resultados y Discusión

La respuesta de tolerancia de las plantas a la falta de agua (sequía), implica una serie de mecanismos anatómicos,

fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Por esta razón, la utilización de criterios de selección basados en estos mecanismos, se convierten en herramientas valiosas para la selección de genotipos adecuados (tolerantes). En el caso de la caraota, algunos autores han descrito la importancia de combinar diferentes criterios de selección a la hora de identificar genotipos adecuados [Lizana *et al.*, (2006); Muñoz-Perea *et al.*, (2006)].

En la observación macroscópica de los genotipos evaluados se pudo apreciar, que todas las plantas mantuvieron un desarrollo muy similar de sus primordios, independientemente del tratamiento aplicado. Las susceptibles mostraron síntomas de marchitez en los tratamientos de estrés severo [Alemán *et al.*, (2010)], (Figura 1).



Figura 1. Diferencias en los síntomas de marchitez de los primordios foliares de cuatro variedades evaluadas de *Phaseolus vulgaris* L., transcurrida una semana de estar sometidas a los regímenes de riego de 70% (control), 40% (estrés moderado) y 20% (estrés severo) de la capacidad de campo.

Los vectores, según su magnitud y dirección, muestran la participación de las variables dentro de cada componente. (Tabla 1)

Tabla 1. Valores de la contribución de las componentes a la variación total.

Variables	CP 1	CP 2
Aper_estomática	-0,6934	0,2461
Prolina 20%	0,6286	0,5953
Fenoles totales hoja	0,5933	0,4711
IE_envés 20 %	0,9063	-0,0906
IE_haz 20 %	0,8808	-0,1676
CRA20%	-0,2808	0,9022

Correlación cofenética= 0,943

El análisis de componentes principales (ACP), se realizó utilizando las 5 variables y mostró que la mayor parte de la variabilidad es explicada por los dos primeros componentes, CP1 (48,40%) y CP2 (24,79%). Estos componentes aportaron en conjunto un 73,19% de la varianza total del ensayo. Las variables cercanas entre si en el biplot presentan patrones similares de respuesta. Las variables con ángulo agudo entre ellas, indican asociación positiva o de comportamiento similar. La ausencia de asociación entre variable es dada por el ángulo recto (90°) entre vectores y la asociación negativa por un ángulo obtuso 180° [Ibáñez *et al.*, (2006)]; Yan *et al.*, (2000)]. Se encontró una asociación alta entre las variables: prolina 20%, fenoles totales hoja, IE envés y haz 20%. La apertura estomática y el CRA correlacionaron positivamente, en cambio el índice estomático se asocia opuestamente a la apertura estomática dado que forman un ángulo obtuso entre ellos. (Figura 2).

En cuanto a la distribución de los tratamientos en función de los 22 genotipos y los dos riegos (T1: 70 % riego normal y T2: 20% (estrés severo) de CC), se encontró dispersión en la ubicación de éstos en los componentes CP1 y CP2 (Figura 2 y 3), que pudiera estar dado a la variabilidad que existe entre ellos. Se observan tres grupos de genotipos bien diferenciados, los tolerantes ubicados en el sector izquierdo y arriba del gráfico y los susceptibles en

el sector derecho. El grupo I incluyó 10 genotipos (CC 259 - colorado C₅ E₈ T- 1551, MGM- 08-02-026 La Poncha blanco 2239, MGM – 08-02-023 rojo 2238, MGM- 10-02-011 Negro 2288, MGM -10-02-029 Negro 2305, MGM- 10 – 02- 078 Rosada con pinta 2350, MGM- 03-99-03 Vaina Blanca Negro 2025, DP- 03- 01-026 Negro de Macaira 2148, “Milagro Villaclareño” -negro C₅ E₃ T - 1460, Bat - 58 C₅ E₇, T- 1380) que muestran una tolerancia a la falta de agua (20% CC). El grupo II incluyó ocho genotipos (MEM – 03-02- 002 Poncha Negro 2215, CC 259 - negro C₆ E₁₁ T- 1567, MGM – 08-02-072 negro 2261, MGM – 10-02- 083 Rosada 2215, MEM – 03-01-01 Plomito Negro 2150, MGM- 08-02-066 negro 2256, MGM- 10-02- 012 Negro 2289, DP- 03-01- 009 Negro Vaina Blanca 2141) que muestran un comportamiento intermedio para la falta de agua y clasificados como medianamente tolerantes. El grupo III incluyó a los 4 genotipos (Tacarigua Negro 07-875, Montalbán Negro 07-875, MGM – 09-02-01 Negro 2279, MGM- 03-02-004 Negro 2216) que se muestran como susceptibles a la falta de agua (20% CC).

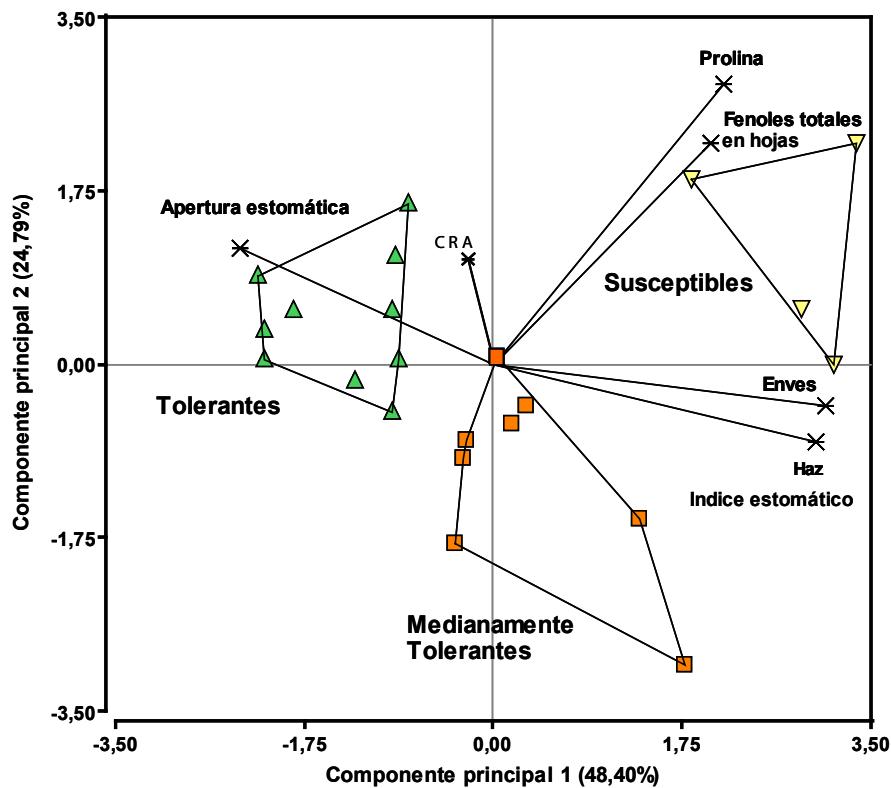


Figura 2. Distribución de los tratamientos para las variables evaluadas según ACP.

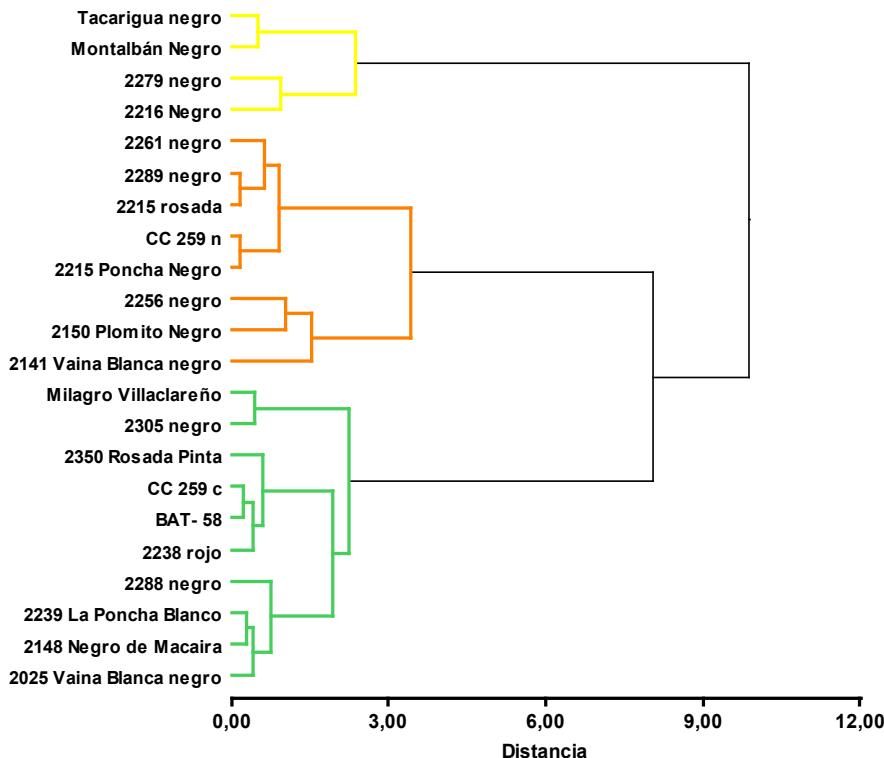


Figura 3. Dendrograma obtenido del análisis de conglomerado para las variables evaluadas.

Conclusiones

De las 5 variables morfológicas y bioquímicas evaluadas en condiciones de invernadero, solo la apertura estomática y el contenido relativo de agua (CRA) presentaron correlaciones con la tolerancia (marchitez) bajo estrés por sequía experimental, las cuales pueden ser utilizadas como criterio de selección de genotipos tolerantes a la sequía en caraota.

Agradecimiento

A la “Empresa Provincial de Semillas de Matanzas”, la donación de las semillas cubanas de *Phaseolus vulgaris* y al Banco de germoplasma del INIA-CENIAP de Venezuela, la donación de los materiales venezolanos que permitieron llevar a cabo esta investigación.

Al Proyecto “Utilización de herramientas biotecnológicas para la identificación y caracterización de variedades de leguminosas resistentes a estrés abiótico”, fuente de financiamiento de esta investigación.

Referencias Bibliográficas

- Broughton, W.J.; Hernandez, G.; Blair, M.; Beebe, S.; Gepts, P.; Vanderleyden, J. (2003). Bean (*Phaseolus* spp.)-model food legumes. *Plant Soil*. 252:55–128.
- Beebe, S.; Rao, I.M.; Cajiao, C.; Grajales, M. (2008). Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Science*. 48: 582-592.
- Cornic, G.; Briantais, J.M. (1991). Partitioning of photosynthesis electron flow between CO_2 and O_2 reduction in a C_3 leaf (*Phaseolus vulgaris* L.) at different CO_2 concentrations and during drought stress. *Planta* 183: 178-184.
- Yordanov, I.; Velikova, V.; Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. *Bulg. J. Plant Physiol.* 187-206.
- Bray, E.A. (2001). Plant response to water deficit Stress. In Encyclopedia of life sciences. Nature Publishing Group, [en línea], de www.els.net.
- Thung, M.; Rao, I. (1999). Integrated management of abiotic stresses. En: Singh, S. (ed.) Common bean improvement in the twenty-first century. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, The Netherlands. 331- 370.
- Rao, I. M. (2001). Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: The case of common bean and tropical forages. In Pessarakli, M. (ed.) *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA. 583-613.
- Rodés, R.; Collazo, M. (2006). Manual de Prácticas de Fotosíntesis. 1^{ra} ed. Universidad Autónoma de México ISBN: 970-32-3313-9.
- Wilkinson, H. (1979). The plant surface (mainly leaf) In: Anatomy of dicotyledons (Metcalfe, C.R. & L. Chalk, eds.). Second edition. Vol. 1. Oxford Clarendon Press. London.
- Ascón, J.; Taylor, M. (2000). Fundamentos de fisiología vegetal. Mc Graw - Hill/ Interamericana de España. Primera Edición. ISBN: 84 - 486 - 0258-7. Cap 2. p18.
- Bates, L. S.; Waldren, R. P.; Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. Short communication. *Plant and Soil*. 39: 205-207.
- Gurr, S.I.; Mc Pherson, M.I.; Bowles, D.J. (1992). Lignin and associated phenolic acids in cell walls. *Molecular Plant Pathology and Practical Approach*. 3: 62-69.
- Hoagland, R.E. (1990). *Alternaria cassiae* alters phenylpropanoid metabolism in Sicklepod (*Casida obtusifolia*). *Phytopath.* 130:177–187.
- Jolliffe, I. T. (2002). Principal Component Analysis, Series: Springer Series in Statistics. 2nd ed. ISBN: 978-0-387-95442-4. 487pp.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C.W. InfoStat version (2010). Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Lizana, C.; Wentworth, M.; Martinez, J.P.; Villegas, D.; Meneses, R.; Murchie, E.H.; Pastenes, C.; Lerzri, B.; Vernieri, P.; Horton, P.; Pinto, M. (2006). Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress. I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 57: 685–697.

Muñoz-Perea, C.G.; Terán, H; Allen, R.G. ; Wright, J.L; Westermann, D.T.; Singh, S.P. (2006). Selection for drought resistance in dry bean landraces and cultivars. *Crop Sci.* 46: 2111–2120.
Alemán, S.; Domínguez, A.; Domínguez,

D.; Fuentes, L.; Pérez, Y.; Pernía, B.; Sosa, D.; Sosa, M.; Infante, D. (2010). Estudio anatómico y bioquímico en materiales cubanos y venezolanos de *Phaseolus vulgaris* L. bajo condiciones de estrés hídrico. *RET.* 1(1): 89-99.